

別紙 1

論文審査の要旨

報告番号	甲第2803号	氏 名	宮野 二美加
論文審査担当者	主査 教授 井上 富雄 副査 教授 馬場 一美 副査 教授 弘中 祥司		
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>学位申請論文「Effect of mastication on adult hippocampal neurogenesis」について、上記の主査 1 名、副査 2 名が個別に審査を行った。</p> <p>脳の神経新生は成人でも認められ、海馬の歯状回に存在する神経幹細胞から分化することで生じる。神経新生の頻度は様々な因子によって制御されていることが知られており、咀嚼もその因子の一つであることが示唆されているが、神経幹細胞の成熟過程のどの時期に影響しているかは明らかとなっていない。そこで本研究は、食餌の固さを変化させた時の海馬の神経新生に対する影響を解析し、神経新生に対する咀嚼の影響を解析した。実験には C57BL/6 雄マウスを用い、離乳直後（3 週齢）に実験群を軟食群と硬食群に分け、生後 7 週と 14 週において、神経幹細胞のマーカーである nestin およびニューロン前駆細胞のマーカーである doublecortin について海馬における陽性細胞数を解析した。さらに生後 14 週において、real-time PCR を用い nestin 遺伝子および doublecortin 遺伝子の海馬における発現を解析した。その結果、生後 14 週において、軟食群の nestin および doublecortin 陽性細胞数と doublecortin 遺伝子の発現量は硬食群に比べて有意に減少した。以上の結果から、軟食は海馬領域の神経新生を抑制する可能性が示唆された。</p> <p>本論文の審査において、副査の馬場委員および弘中委員から多くの質問があり、その一部とそれらに対する回答を以下に示す。</p> <p>馬場委員の質問とそれらに対する回答：</p> <p>1. qRT-PCR と免疫染色の結果において、7 週齢に比較し 14 週齢でより顕著な差が確認された理由は何か。 (過去において、離乳後に長期間（6～12 ヶ月） powder diet もしくは soft diet を与えた群はコントロール群に比べ、海馬の神経細胞の増殖能が低下したとの報告がある。本実験においても同様に、離乳直後から長期にわたり軟食を与えたマウスにおいて、海馬の神経新生の低下が有意に認められた。以上のことより、離乳直後から、より長期にわたる軟食は海馬の神経新生を有意に低下させると考えられる)</p> <p>2. これらの結果から変化が想定される signaling pathway にはどのようなものがあるか。 (神経細胞間の情報伝達を担う calcium signaling pathway や細胞増殖/生存に関わる PI3K-Akt signaling pathway, Ras/Raf/MAPK pathway などに変化が生じている可能性が考えられる)</p> <p>3. 食物の硬度の違いによって生じる変化として体重増加以外に考えられるものは何か？ (軟性飼料を与えた過去の報告において、耳下腺の障害、アミラーゼ含有量の減少、免疫機能の低下（副腎重量の増加、NK 細胞活性の低下、血漿中の ACTH レベルの変動、筋量の減少や全身持久力の減少が報告されている。また、脳細胞の代謝を指標とする PET を用いた観察では一次感覚運動野、補足運動野、島、小脳、線条体の活性化、fMRI を用いた観察では、感覚運動野、補足運動野、視床、小脳、右側前頭前野の活性化がそれぞれ確認されている。前頭前野の活性化は、脳血流を指標とする fNIRS (近赤外分光法) を用いた観察でも確認されている。この領域は、高齢者の著明な亢進が認められたことから、咀嚼は、認知機能の維持に</p>			

有用な可能性や高い認知機能の長時間の維持にも有用な可能性が示唆されている)

弘中委員の質問とそれらに対する回答：

1. 実験動物に C57BL/6Jmice を選んだ理由は何か。

(本研究は、我々のグループが行った専攻研究の続報として実験を行った。そのため、使用動物は前回と同様に C57BL/6Jmice を選択した)

2. 7W で有意差がなく、14W で有意差が出たのはなぜか。

(過去において、離乳後に長期間 (6~12 ヶ月) powder diet もしくは soft diet を与えた群はコントロール群に比べ、海馬の神経細胞の増殖能が低下したとの報告がある。本実験においても同様に、離乳直後から長期にわたり軟食を与えたマウスにおいて、海馬の神経新生の低下が有意に認められた。以上のことより、離乳直後から、より長期にわたる軟食は海馬の神経新生を有意に低下させると考えられる)

3. 体重に有意差が出たことに対して説明せよ。

(離乳後の軟食がストレスや栄養摂取などの全身に与える影響を調べるため 7 週齢と 14 週齢で各々のマウスについて体重測定を行った。7 週齢では体重に統計的な差は認められたが、14 週齢では認められなかった。7 週齢でのみ有意差が認められたのは、軟食によるストレスが短期的に強く影響し、14 週齢ではその環境に順応したことにより差がなくなったものと考え)

両副査は、上記を含めた質問に対する回答が、いずれも満足のいくものであることを確認した。

主査 井上委員の質問とそれらに対する回答：

1. 咀嚼が海馬のニューロン新生を起こす要因の一つであるとする根拠は何か。

(過去の報告において、臨床的には、歯の喪失が記憶学習能力の衰退に関係することや、歯の欠損数や咬合力の低下が認知症やアルツハイマー症の発症、進行に関係することが報告されている。実験的には、咀嚼を十分に行わせない方法として、粉末飼料を用いた軟食飼育や歯の削合、抜歯が行われている。海馬は記憶や空間認知能力に関与しており、重要な役割を果たしている。粉末飼料で飼育を行ったマウスの海馬では、固形飼料で飼育したマウスと比較して神経新生が減少を示し、記憶学習能力を評価する行動試験において有意な低下が認められた事を報告されている。歯の削合が、アルツハイマー症の発症と関係することが報告されたまた抜歯されたラットは空間記憶を評価する行動試験で有意な低下が認められたとの報告がある。このことより、咀嚼刺激の減少は神経新生の減少につながる要因の一つであると判断した)

2. Nestin と DCX を用い、神経の分化を 2 つの段階に分けて解析した理由は何か。

(過去の報告では、軟食による神経新生について BrdU による標識で評価をしていた。しかし、BrdU により標識された細胞は、幹細胞の cell サイクルの特徴を利用し新生された神経細胞を識別しているにすぎず、その細胞の分化段階を観察することは出来ない。したがって、今回、軟食による神経新生への影響がどのステージの細胞に影響を与えているのかを評価するため、神経幹細胞の分化ステージに応じた特異的マーカーである nestin と DCX を用いた)

主査の井上委員は、両副査の質問に対する回答の妥当性を確認するとともに、本論文の主張をさらに確認するために上記の質問をしたところ、明確かつ適切な回答が得られた。

以上の審査結果から、本論文を博士 (歯学) の学位授与に値するものと判断した。